·论著·

二甲双胍通过NLRP3炎症小体通路对皮肤角质形成细胞增殖和凋亡的双向调节研究

田珂[1]，冷秋枫[1]，吕晶[2]，苗国英[1*]，王新慧[1]，谢辉[1]，刘渠[1]，姚春霞[3*]

1.056002 河北省邯郸市，河北工程大学附属医院皮肤科
2.056038 河北省邯郸市，河北工程大学医学院生理教研室
3.056038 河北省邯郸市，河北工程大学医学院病理教研室
*通信作者：苗国英，主任医师；E-mail：guoyingmiao@163.com
姚春霞，副教授；E-mail：yaoyao20050208@163.com

【摘要】 **背景** 扁平苔藓是一种皮肤-黏膜慢性炎症性疾病。因其病因不明，许多患者治疗效果欠佳，严重影响生活质量，有必要深入研究扁平苔藓的发病机制，为其药物筛选提供新靶点。**目的** 探讨二甲双胍通过NLRP3炎症小体通路对皮肤角质形成细胞增殖和凋亡的调控作用。**方法** 实验时间为2020年1月—2023年12月。体外实验以人永生化角质形成细胞株HaCaT为研究对象，分为4组：对照组、脂多糖（LPS）组（5 μg/mL）、二甲双胍组（Met组：10 mmol/L）、LPS与二甲双胍联合组（LPS+Met组：LPS 5 μg/mL刺激2 h后，再给予二甲双胍10 mmol/L处理）。体内实验以BALB/c小鼠为研究对象，利用咪喹莫特涂抹小鼠背部皮肤诱导了银屑病样皮炎模型，并制备了二甲双胍乳膏进行治疗，将小鼠随机分为3组：对照组、咪喹莫特组（IMQ组）、咪喹莫特与二甲双胍联合组（IMQ+Met组），每组10只；对照组小鼠于背部涂抹凡士林，IMQ组小鼠于背部涂抹咪喹莫特软膏，IMQ+Met组小鼠于背部涂抹IMQ软膏12 h后再涂抹二甲双胍乳膏；1次/d，连续7 d。采用细胞增殖试剂盒（CCK-8）和流式细胞术检测二甲双胍对HaCaT细胞增殖和凋亡的影响；采用Western Blot、酶联免疫吸附实验（ELISA）和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1（Caspase-1）活性实验检测二甲双胍处理HaCaT细胞后NLRP3炎症小体通路的蛋白表达情况及活性水平；最后采用皮肤组织切片苏木精-伊红（HE）染色和免疫组化检测二甲双胍对咪喹莫特诱导银屑病小鼠皮炎的抗炎效果。**结果** CCK-8实验结果显示：LPS组、Met组、LPS+Met组HaCaT细胞48 h存活率均低于对照组，而LPS+Met组HaCaT细胞48 h存活率高于LPS组（$P<0.05$）。流式细胞术结果显示：LPS组、Met组HaCaT细胞48 h G2/M期细胞、细胞凋亡比例均高于对照组，而LPS+Met组HaCaT细胞48 h G2/M期细胞、细胞凋亡比例低于LPS组（$P<0.05$）。Western blot结果显示：LPS组、Met组HaCaT细胞NOD样受体蛋白3（NLRP3）炎症小体通路Caspase-1 p40、Caspase-1 p20、白介素（IL）-1β、IL-18蛋白表达均高于对照组，而LPS+Met组HaCaT细胞NLRP3炎症小体通路Caspase-1 p40、Caspase-1 p20、IL-1β、IL-18蛋白表达低于LPS组（$P<0.05$）。ELISA实验结果显示：LPS组、Met组HaCaT细胞NLRP3炎症小体通路IL-1β、IL-18水平、Caspase-1相对活性均高于对照组，而LPS+Met组HaCaT细胞NLRP3炎症小体通路IL-1β、IL-18水平、Caspase-1相对活性低于LPS组（$P<0.05$）。皮肤组织切片HE染色显示：IMQ+Met组小鼠二甲双胍涂抹明显改善了咪喹莫特对皮肤的损害。免疫组化结果显示：IMQ+Met组小鼠则显著降低了NLRP3、Caspase-1、IL-1β和IL-18的表达。**结论** 甲双胍通过NLRP3炎症小体通路双向调节皮肤角质形成细胞的增殖和凋亡，并能够改善咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠的皮肤损害，有望为二甲双胍临床上用于治疗扁平苔藓提供理论依据。

【关键词】 二甲双胍；NLRP3炎症小体；HaCaT细胞；细胞增殖；细胞凋亡；扁平苔藓；银屑病；小鼠
【中图分类号】 R 977.15　R 329.25　【文献标识码】 A　DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2024.0042

Bidirectional Regulation of Keratinocyte Proliferation and Apoptosis by Metformin via NLRP3

基金项目：河北省科技厅重点研发计划项目（20377795D）；河北省教育厅科技计划项目（ZD2022002）；邯郸市科技计划项目（19422083008-67）

引用本文：田珂，冷秋枫，吕晶，等. 二甲双胍通过NLRP3炎症小体通路对皮肤角质形成细胞增殖和凋亡的双向调节研究［J］. 中国全科医学，2024. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2024.0042.［Epub ahead of print］.［www.chinagp.net］

TIAN K，LENG Q F，LYU J，et al. Bidirectional regulation of keratinocyte proliferation and apoptosis by metformin via NLRP3 inflammasome pathway［J］. Chinese General Practice，2024.［Epub ahead of print］.

Inflammasome Pathway

TIAN Ke[1], *LENG Qiufeng*[1], *LYU Jing*[2], *MIAO Guoying*[1*], *WANG Xinhui*[1], *XIE Hui*[1], *LIU Qu*[1], *YAO Chunxia*[3*]
1.Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan 056002, China
2.Department of Physiology, Medical College, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China
3.Department of Pathology, Medical College, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China
**Corresponding authors: MIAO Guoying, Chief physician; E-mail: guoyingmiao@163.com*
YAO Chunxia, Associate professor; E-mail: yaoyao20050208@163.com

【Abstract】 **Background** Lichen planus is a chronic inflammatory disease of the skin and mucosa. Due to its unknown etiology, many patients have poor treatment effect, which seriously affects the quality of life. It is necessary to further study the pathogenesis of lichen planus to provide a new target for drug screening. **Objective** To investigate the effects of metformin on keratinocyte proliferation and apoptosis through NLRP3 inflammasome pathway. **Methods** Experiment period: January 2020 to December 2023. In vitro experiment, human immortalized keratinocytes (HaCaT) were divided into 4 groups: control group, lipopolysaccharide group (LPS group: 5μg/mL), metformin group (Met group: 10mmol/L), LPS combined with metformin group (LPS+Met group: metformin was treated with 10mmol/L after LPS 5μg/mL stimulation for 2 hours). In vivo experiments, BALB/c mice were used as research objects to induce psoriatic dermatitis model by applying imiquimod on the back skin, and metformin cream was prepared for treatment. The mice were randomly divided into 3 groups: control group, imiquimod group (IMQ group), and imiquimod plus metformin group (IMQ+Met group). Each group has 10 mice. Mice in the control group were smeared with petroleum jelly on the back, mice in the IMQ group were smeared with imiquimod ointment on the back, mice in the IMQ+Met group were smeared with metformin cream after 12 h of IMQ ointment. Once a day for seven consecutive days. Cell counting kit-8 (CCK-8) and flow cytometry were used to detect the effects of metformin on the proliferation and apoptosis of HaCaT cells. Western Blot, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Caspase-1 activity assay were used to detect the expression and activity of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome pathway protein in HaCaT cells treated with metformin. Finally, hematoxylin-eosin (HE) staining and immunohistochemistry were used to detect the anti-inflammatory effect of metformin on imiquimod-induced psoriatic dermatitis in mice. **Results** The results of CCK-8 experiment showed that the 48 h survival rate of HaCaT cells in LPS, Met and LPS+Met groups were lower than that in control group, while the 48 h survival rate of HaCaT cells in LPS+Met group was higher than that in LPS group ($P<0.05$). Flow cytometry results indicated that the proportions of G2/M phase and apoptosis of HaCaT cells at 48 h in LPS and Met groups were higher than those in control group, while the proportion of G2/M phase and apoptosis of HaCaT cells at 48 h in LPS+Met group were lower than those in LPS group ($P<0.05$). Western Blot results demonstrated that the expression of Caspase-1 p40, Caspase-1 p20, interleukin (IL)-1β and IL-18 proteins in NLRP3 inflammasome pathway of HaCaT cells in LPS and Met groups were higher than those in control group. The expression of Caspase-1 p40, Caspase-1 p20, IL-1β and IL-18 of HaCaT cells in LPS+Met group were lower than those in LPS group ($P<0.05$). ELISA results showed that the levels of IL-1β, IL-18 and relative activity of Caspase-1 in NLRP3 inflammasome pathway of HaCaT cells in LPS and Met groups were higher than those in control group. The levels of IL-1β, IL-18 and relative activity of Caspase-1 of HaCaT cells in LPS+Met group were lower than those in LPS group ($P<0.05$). Metformin application in IMQ+Met group significantly improved the imiquimod skin damage observed by HE staining. Immunohistochemical results reported that the expressions of NLRP3, Caspase-1, IL-1β and IL-18 were significantly decreased in IMQ+Met group. **Conclusion** Metformin bidirectional regulates the proliferation and apoptosis of skin keratinocytes through the NLRP3 inflammasome pathway, and can improve the skin damage induced by imiquimod in psoriasis mice, which is expected to provide a theoretical basis for the clinical use of metformin in the treatment of lichen planus.

【Key words】 Metformin; NLRP3 inflammasome; HaCaT cells; Cell proliferation; Cell apoptosis; Lichen planus; Psoriasis; Mice

扁平苔藓（lichen planus，LP）主要表现为紫色、多角形、扁平的斑丘疹，伴瘙痒或无自觉症状，多发生于口腔黏膜和四肢、躯干皮肤，口腔 LP 患病率高于皮肤 LP，还可累及外阴黏膜、掌跖部、指（趾）甲等特殊部位，可致糜烂性损害、甲床萎缩、翼状胬肉等，部分病例有恶变倾向[1-4]。因其病因尚不完全清楚，现有的治疗方法效果欠佳，严重影响了患者的生活质量[5]。

有研究表明角质形成细胞的凋亡、分泌的细胞因子及其与 T 细胞的相互作用等参与 LP 的发病[6]。近年来还发现 LP 患者易出现系统性红斑狼疮、白癜风、斑秃、心血管疾病等合并症[7-9]。而且，LP 患者中肥胖、血脂异常、糖尿病等更常见[10]。二甲双胍是治疗 2 型糖

尿病的一线药物，尤其适用于肥胖人群。近来研究发现二甲双胍具有非常广泛的药理作用，能够发挥抗肿瘤、抗雄激素、抗炎等效应[11]，在治疗痤疮、黑棘皮病、银屑病等炎症性皮肤病时表现出明显的疗效[12]。但是二甲双胍能否用于治疗 LP，报道鲜见。本研究主要观察了二甲双胍对皮肤角质形成细胞的增殖和凋亡的调控作用，并探讨其分子机制，为二甲双胍临床上用于治疗 LP 提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 实验时间

本研究具体实验时间为 2021 年 3 月—2023 年 12 月。

1.2 实验对象

人永生化角质形成细胞株 HaCaT 购买自中国科学院细胞库；8 周龄 BALB/c 小鼠购买自北京华阜康生物科技股份有限公司，实验动物许可证号：SCXK（京）2019-0008。本研究于 2021 年 3 月获得河北工程大学医学院生物医学伦理委员会批准（BER-YXY-2021023）。

1.3 实验材料

主要试剂：脂多糖（LPS）和二甲双胍（Met）购买自 Sigma 公司，IMQ 乳膏（丽科杰）来自湖北科益药业股份有限公司，细胞增殖试剂盒（CCK-8 法）购买自 MCE 公司，ELISA 和 Caspase-1 活性检测试剂盒购买自 MSK 生物公司，流式凋亡检测试剂盒购买 BD 公司，NOD 样受体蛋白 3（NLRP3）、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1（Caspase-1）、白介素（IL）-1β、IL-18 和甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（GAPDH）一抗购买自 Proteintech 公司。

主要仪器：多功能酶标仪（Bio-Rad），流式细胞仪（BD FACSLyric），光学显微镜（奥林巴斯），Western Blot 成像系统（Odyssey® XF），石蜡切片机（Leica）。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养与分组：人永生化角质形成细胞株 HaCaT 培养条件为：改良 Eagle's 高糖培养基（DMEM）添加 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素，37 ℃，5%CO_2。细胞融合度达 80% 时，进行传代，调整细胞浓度接种至 6 孔板或 96 孔板，按要求进行后续实验。细胞随机分为 4 组，依次为：对照组、脂多糖（LPS）组（5 μg/mL）、二甲双胍组（Met 组：10 mmol/L）、LPS 与二甲双胍联合组（LPS+Met 组：LPS 5 μg/mL 刺激 2 h 后，再给予二甲双胍 10 mmol/L 处理）。每组 3 复孔，重复 3 次实验。

1.4.2 CCK-8 法检测细胞活性：细胞以 1×10^4 个 / 孔接种于 96 孔板，按实验要求给予不同刺激处理，每种处理设 5 个复孔，培养至 24 h、48 h、72 h 后，加入 CCK-8 试剂 10 μL/ 孔，再培养 1 h 后，酶标仪测定 450 nm 波长的吸光度（OD）值。细胞存活率（%）=（实验组平均 OD 值 - 空白组平均 OD 值）/（对照组平均 OD 值 - 空白组平均 OD 值）×10^0%。实验重复 3 次。

1.4.3 Western Blot：利用蛋白裂解液（RIPA）提取不同处理组 HaCaT 细胞中的总蛋白，蛋白定量试剂盒（BCA 法）进行蛋白定量，40 μg 上样电泳，转移至聚偏二氟乙烯膜（PVDF），5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h，一抗 4 ℃孵育过夜。洗涤缓冲液（TBST）漂洗 3 次，5 min/ 次。二抗室温孵育 1 h，发光试剂盒（ECL 法）显影定影，GAPDH 作内参。

1.4.4 酶联免疫吸附实验（ELISA）：HaCaT 细胞以 3×10^6 个 /mL 接种于 6 孔板，分别加入磷酸缓冲液（PBS）、LPS、Met、LPS+Met 联合处理，48 h 后，收集培养基上清液，2000 rpm 离心 10 min，留取上清液，按照试剂盒说明书操作，检测细胞培养基上清中 IL-1β 和 IL-18 的浓度。每种处理设 3 复孔，实验重复 3 次。

1.4.5 流式细胞术分析细胞周期和凋亡：HaCaT 细胞以 3×10^6 个 /ml 接种于 6 孔板过夜培养后，别加入 PBS、LPS、LPS、Met、LPS+Met 联合处理，48 h 后收集细胞，PBS 漂洗 3 遍，直接碘化丙啶（PI）染色，或加入 Annexin V-FITC 避光室温孵育 15 min 后，再进行流式细胞仪检测，计算细胞凋亡率，或处于 G0/G1、S、G2/M 期的细胞比例。每种处理设 3 复孔，重复 3 次。

1.4.6 二甲双胍乳膏的制备：油相为液体石蜡 10 g，十八醇、硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、尼泊金乙酯各 5 g，加热至 75 ℃ ~80 ℃混匀备用；水相为甘油 10 g，脂肪醇聚氧乙烯醚 1.5 g，吐温 1 g，加入少量蒸馏水，加热至 75 ℃ ~80 ℃混匀备用；加入 0.6 g 二甲双胍至水相中充分溶解，将水相缓慢加入油相中，搅拌混匀，加蒸馏水填充至 100 g，最后将乳膏冷却至室温，备用[13]。

1.4.7 咪喹莫特诱导小鼠银屑病样皮炎模型的建立：由于缺乏 LP 动物模型，为了观察二甲双胍在整体水平对皮肤炎症性疾病的影响，本研究利用咪喹莫特涂抹小鼠背部皮肤诱导了银屑病样皮炎模型，并制备了二甲双胍乳膏进行治疗。将 BALB/c 小鼠随机分为 3 组：对照组，咪喹莫特组（IMQ 组），咪喹莫特与二甲双胍联合组（IMQ+Met 组），每组 10 只。对照组小鼠于背部涂抹凡士林，IMQ 组小鼠于背部涂抹咪喹莫特软膏，IMQ+Met 组小鼠于背部涂抹 IMQ 软膏 12 h 后再涂抹二甲双胍乳膏。涂抹面积 2 cm×2 cm，1 次 /d，连续 7 d。

1.4.8 石蜡切片与苏木素 - 伊红（HE）染色：咪喹莫特诱导小鼠银屑病样皮炎 8 d 后处死小鼠，取背部皮肤固定于 4% 多聚甲醛中 48 h，脱水、包埋、切片、水化、HE 染色、脱水透明、中性树胶封片。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计学软件进行数据分析。本研究计量资料符合正态分布，以（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍对 HaCaT 细胞增殖和凋亡的影响

2.1.1 CCK-8 实验结果显示：不同浓度的二甲双胍（1、2、5、10、20 mmol/L）对 HaCaT 细胞的增殖均有抑制作用，且浓度越高，抑制作用越明显，药物浓度与处理时间有交互作用，各浓度细胞存活率随时间变化呈下降趋势（图 1）。在后续实验中，选择对 HaCaT 细胞增殖抑制明显且毒性相对较小的 10 mmol/L 二甲双胍处理 48 h 作为观察点进行实验。4 组 HaCaT 细胞 48 h 存活率比较，差异有统计学意义（P<0.05）；其中 LPS 组、Met 组、LPS+Met 组 HaCaT 细胞 48 h 存活率均低于对照组，而 LPS+Met 组 HaCaT 细胞 48 h 存活率高于 LPS 组，差异有统计学意义（P<0.05），见表 1。

2.1.2 流式细胞术结果显示：4 组 HaCaT 细胞 48 h G2/M 期细胞比例比较，差异有统计学意义（P<0.05）；其中 LPS 组、Met 组 HaCaT 细胞 48 h G2/M 期细胞比例均高于对照组，而 LPS+Met 组 HaCaT 细胞 48 h G2/M 期细胞比例低于 LPS 组，差异有统计学意义（P<0.05），见表 2、图 2A。4 组 HaCaT 细胞 48 h 细胞凋亡比例比较，差异有统计学意义（P<0.05）；其中 LPS 组、Met 组 HaCaT 细胞 48 h 细胞凋亡比例均高于对照组，而 LPS+Met 组 HaCaT 细胞 48 h 细胞凋亡比例低于 LPS 组，差异有统计学意义（P<0.05），见表 2、图 2B。

表 1 4 组 HaCaT 细胞 48 h 存活率比较（$\bar{x} \pm s$，%）

Table 1 Comparison of 48 h survival rate of HaCaT cells in 4 groups

组别	次数	细胞存活率
对照组	3	100.00 ± 0.00
LPS 组	3	62.42 ± 6.21[a]
Met 组	3	68.66 ± 3.40[a]
LPS+Met 组	3	75.68 ± 4.35[abc]
F 值		243.284
P 值		<0.001

注：LPS= 脂多糖，Met= 二甲双胍；Met 组与 LPS+Met 组二甲双胍均为 10 mmol/L；[a] 表示与对照组比较 P<0.05，[b] 表示与 LPS 组比较 P<0.05。

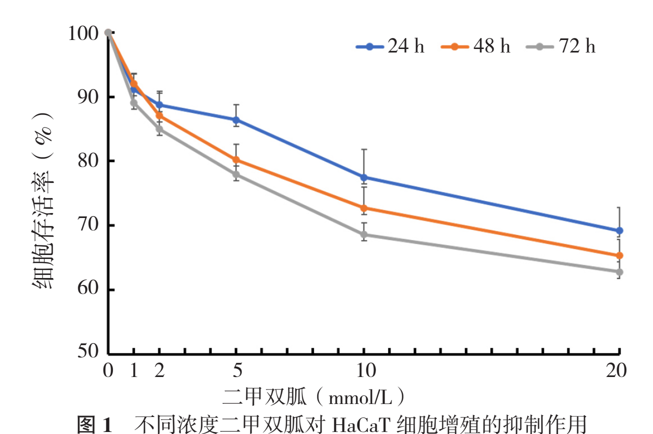
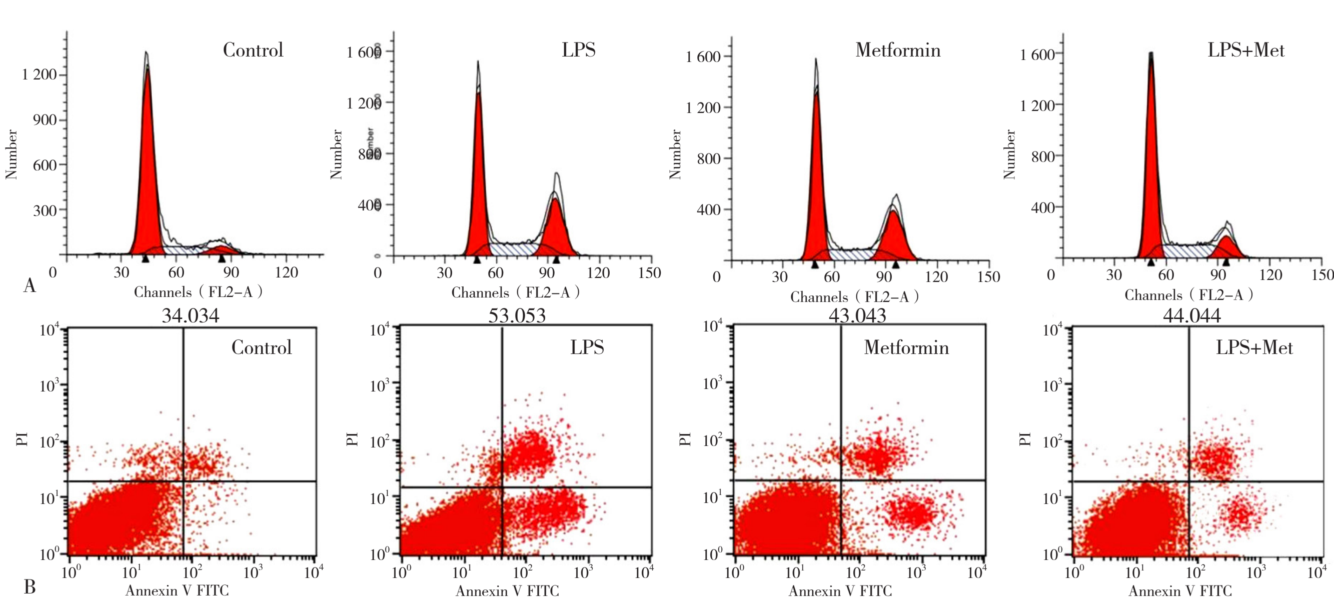


图 1 不同浓度二甲双胍对 HaCaT 细胞增殖的抑制作用

Figure 1 Inhibitory effect of metformin at different concentrations on HaCaT cell proliferation

2.2 二甲双胍对 HaCaT 细胞 NLRP3 炎症小体通路的影响



注：A 为各组细胞周期图，B 为各组细胞凋亡图；Control 为对照组，LPS 为脂多糖组，Metformin 为二甲双胍组，LPS+Met 为脂多糖与二甲双胍联合组，Met 组与 LPS+Met 组二甲双胍均为 10 mmol/L。

图 2 4 组 HaCaT 细胞 48 h 流式细胞术结果

Figure 2 48 h flow cytometry results of HaCaT cells in 4 groups

表 2 4 组 HaCaT 细胞 48 h 流式细胞术结果比较（$\bar{x}$ ± s，%）

Table 2 Comparison of 48 h flow cytometry results of HaCaT cells in 4 groups

组别	次数	G2/M 期细胞比例	细胞凋亡比例
对照组	3	9.50 ± 1.31	1.26 ± 0.15
LPS 组	3	28.96 ± 0.94[a]	16.91 ± 1.00[a]
Met 组	3	20.31 ± 1.27[a]	12.92 ± 0.98[a]
LPS+Met 组	3	14.44 ± 0.88[ab]	7.47 ± 1.61[ab]
F 值		338.179	241.729
P 值		<0.001	<0.001

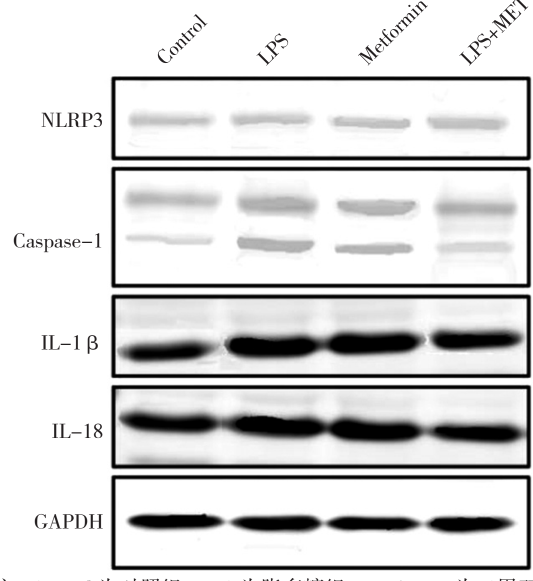
注：LPS= 脂多糖，Met= 二甲双胍；Met 组与 LPS+Met 组二甲双胍均为 10 mmol/L；[a] 表示与对照组比较 P<0.05，[b] 表示与 LPS 组比较 P<0.05。

2.2.1 Western Blot 结果显示：4 组 HaCaT 细胞 NLRP3 蛋白表达比较，差异无统计学意义（P>0.05）；4 组 HaCaT 细 NLRP3 炎症小体通路 Caspase-1 活性亚基 p40 和 p20、IL-1β、IL-18 蛋白表达比较，差异有统计学意义（P<0.05）。其中 LPS 组、Met 组 HaCaT 细胞 NLRP3 炎症小体通路 Caspase-1 p40、Caspase-1 p20、IL-1β、IL-18 蛋白表达均高于对照组，而 LPS+Met 组 HaCaT 细胞 NLRP3 炎症小体通路 Caspase-1 p40、Caspase-1 p20、IL-1β、IL-18 蛋白表达低于 LPS 组，差异有统计学意义（P<0.05），见表 3、图 3。

2.2.2 ELISA 实验结果显示：4 组 HaCaT 细胞 NLRP3 炎症小体通路 IL-1β、IL-18 水平、Caspase-1 相对活性比较，差异有统计学意义（P<0.05）。其中 LPS 组、Met 组 HaCaT 细胞 NLRP3 炎症小体通路 IL-1β、IL-18 水平、Caspase-1 相对活性均高于对照组，而 LPS+Met 组 HaCaT 细胞 NLRP3 炎症小体通路 IL-1β、IL-18 水平、Caspase-1 相对活性低于 LPS 组，差异有统计学意义（P<0.05），见表 4。

2.3 二甲双胍对咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样皮炎的治疗作用

2.3.1 小鼠皮肤外观表现：3 组 BALB/c 小鼠经相应药物处理 7 d 后，IMQ 组小鼠背部涂抹区出现轻微鳞屑和部分红斑（图 4B），而 IMQ+Met 组小鼠涂抹二甲双胍后可以改善皮损的严重程度（图 4C）。



注：Control 为对照组，LPS 为脂多糖组，Metformin 为二甲双胍组，LPS+Met 为脂多糖与二甲双胍联合组，Met 组与 LPS+Met 组二甲双胍均为 10 mmol/L；Caspase-1= 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1，IL= 白介素，GAPDH= 甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶。

图 3 二甲双胍调控 HaCaT 细胞 NLRP3 炎症小体通路蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of metformin on the protein level of NLRP3 inflammasome pathway in HaCaT cells

表 4 4 组 HaCaT 细胞 NLRP3 炎症小体通路蛋白水平比较（$\bar{x}$ ± s）

Table 4 Comparison of NLRP3 inflammasome pathway protein levels in 4 groups of HaCaT cells

组别	次数	IL-1β（pg/mL）	IL-18（pg/mL）	Caspase-1 相对活性
对照组	3	12.69 ± 2.02	7.21 ± 2.95	1.00 ± 0.00
LPS 组	3	67.67 ± 8.57[a]	36.49 ± 5.18[a]	4.25 ± 0.53[a]
Met 组	3	54.79 ± 6.54[a]	26.05 ± 4.46[a]	2.97 ± 0.36[a]
LPS+Met 组	3	33.92 ± 5.75[ab]	19.01 ± 3.91[ab]	1.84 ± 0.21[ab]
F 值		136.806	77.100	165.450
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注：LPS= 脂多糖，Met= 二甲双胍；Met 组与 LPS+Met 组二甲双胍均为 10 mmol/L；[a] 表示与对照组比较 P<0.05，[b] 表示与 LPS 组比较 P<0.05。

表 3 4 组 HaCaT 细胞 NLRP3 炎症小体通路蛋白表达比较（$\bar{x}$ ± s）

Table 3 Comparison of NLRP3 inflammasome pathway protein expression in 4 groups of HaCaT cells

组别	次数	NLRP3	Caspase-1 p40	Caspase-1 p20	IL-1β	IL-18
对照组	3	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
LPS 组	3	1.00 ± 0.03	1.73 ± 0.03[a]	1.78 ± 0.04[a]	1.75 ± 0.05[a]	1.50 ± 0.05[a]
Met 组	3	1.03 ± 0.05	1.44 ± 0.05[a]	1.61 ± 0.04[a]	1.60 ± 0.0[a]	1.58 ± 0.04[a]
LPS+Met 组	3	0.98 ± 0.03	0.98 ± 0.03[ab]	1.20 ± 0.04[ab]	1.19 ± 0.05[ab]	1.03 ± 0.04[ab]
F 值		2.407	615.153	644.506	443.592	319.418
P 值		0.265	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

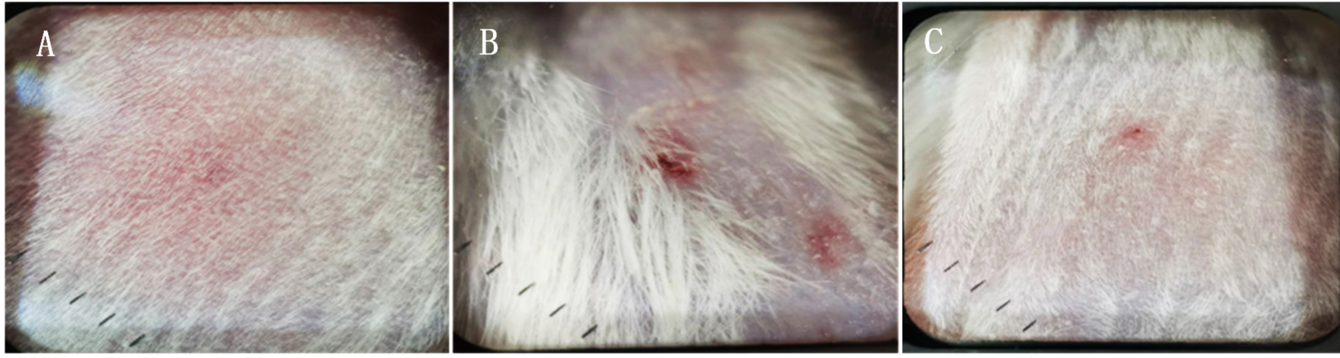
注：Caspase-1= 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1，IL= 白介素；Met 组与 LPS+Met 组二甲双胍均为 10 mmol/L；[a] 表示与对照组比较 P<0.05，[b] 表示与 LPS 组比较 P<0.05。

2.3.2 皮肤组织切片 HE 染色显示：IMQ 组表皮明显增厚，伴角化不全或角化过度，棘突延长（图 5B），基底层细胞增厚（图 5E），炎性充血明显（图 5H）；而 IMQ+Met 组小鼠二甲双胍涂抹则明显改善了咪喹莫特对皮肤的损害（图 5C、5F、5I）。

2.3.3 免疫组化结果显示：IMQ 组小鼠皮肤中 NLRP3、Caspase-1、IL-1β 和 IL-18 呈阳性表达，而 IMQ+Met 组小鼠则显著降低了 NLRP3、Caspase-1、IL-1β 和 IL-18 的表达，见图 6。

3 讨论

二甲双胍是国内外内分泌指南推荐的治疗 2 型糖尿病的一线药物，通过促进外周组织对葡萄糖的摄取和利用，发挥降血糖作用。除了降低血糖，二甲双胍还能够



注：A 为对照组，B 为 IMQ 组，C 为 IMQ+Met 组。

图 4 二甲双胍改善咪喹莫特诱导的银屑病样皮炎外观表现

Figure 4 Metformin improves the appearance of imiquimod-induced psoriatic dermatitis

对照组 IMQ 组 IMQ+Met 组

HIE 染色（×100） A B C

HIE 染色（×400） D E F

HIE 染色（×200） G H I

注：HE= 苏木素 - 伊红。

图 5 3 组 BALB/c 小鼠皮肤组织切片 HE 染色结果

Figure 5 Results of HE staining in skin sections of 3 groups of BALB/c mice

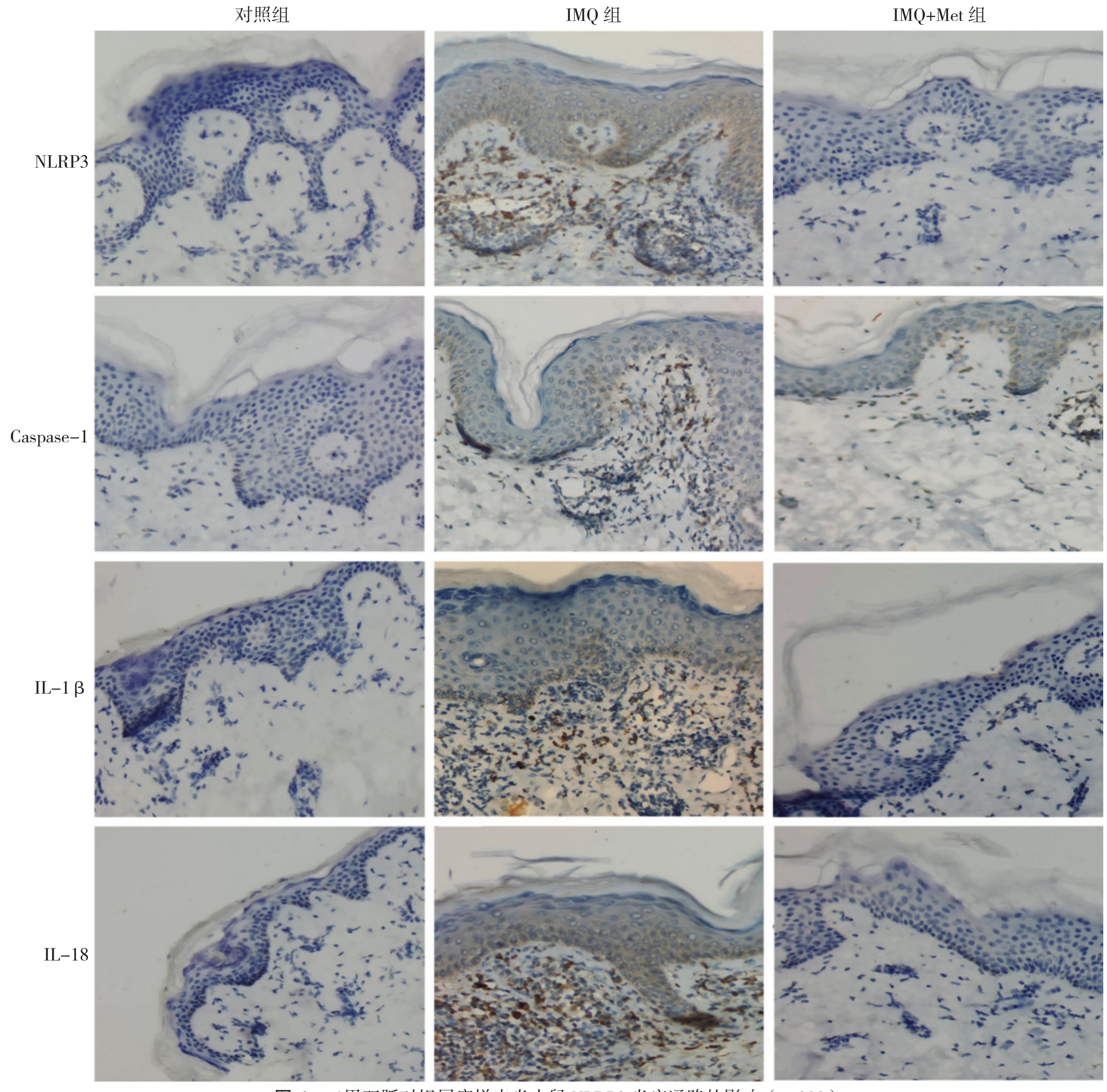


图 6 二甲双胍对银屑病样皮炎小鼠 NLRP3 炎症通路的影响（×200）
Figure 6 Effect of metformin on NLRP3 inflammasome pathway in mice with psoriatic dermatitis

抑制核因子 κB（NF-κB）通路而对肿瘤的转移和侵袭发挥抑制作用[14]；能够抑制氧化应激和炎症而延缓细胞老化进程[15]；而且，来自细胞、动物模型和临床试验的证据表明，二甲双胍具有抗炎特性，在很多炎症驱动的疾病治疗中表现出治疗潜力[16]，也被尝试用于治疗多种炎症性皮肤病[12，17]。但是二甲双胍在治疗皮肤慢性炎症性疾病 LP 中的应用，报道较少，且曾有案例报道二甲双胍的应用诱发了类天疱疮 LP[18]。因此有必要深入研究二甲双胍的抗炎效应能否用于治疗 LP。

LP 的组织病理主要表现为上皮角化过度或不全、棘层增厚、基底细胞液化变性等[4]。角质形成细胞功能异常在 LP 的发病中发挥着重要作用。角质形成细胞的凋亡、分泌的细胞因子、及其与 T 淋巴细胞间的相互作用均参与了 LP 的发病[1，19]，是 LP 治疗的重要靶点。有研究发现二甲双胍通过抑制雷帕霉素靶蛋白（mTOR）通路，以浓度和时间依赖的方式抑制人角质形成细胞 HaCaT 的细胞生长和增殖，诱导细胞凋亡，抑制细胞分泌 IL-6、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）等细胞因子[20]。在紫外线 B（UVB）诱导皮肤急性光损伤的细胞模型中，二甲双胍能够减轻 UVB 辐后 HaCaT 细胞产生的炎症和细胞凋亡[13]。二甲双胍还能通过抑制 NLRP3 炎症小体通路降低炎症因子的释放，有望成为治疗化脓性汗腺炎的选择[21]。

LPS 是细菌表面抗原物质，常被用于炎性损伤模型。

由于缺乏 LP 动物模型，本研究利用 LPS 刺激 HaCaT 细胞构建炎性模型，模拟 LP 的炎症病理。结果显示 LPS 抑制 HaCaT 细胞增殖、促进凋亡、促进炎症因子释放。与 LPS 的效应相似，二甲双胍处理 HaCaT 细胞后，抑制细胞增殖、促进凋亡、促进炎症因子释放，且该效应随二甲双胍浓度增大而增加。进一步探索潜在的分子机制发现，二甲双胍激活了 HaCaT 细胞的 NLRP3 炎症小体通路，提高了 Caspase-1 的活性以及炎症因子 IL-1β 和 IL-18 的分泌，即二甲双胍处理 HaCaT 细胞，表现出了致炎作用。但是在以 LPS 刺激 HaCaT 细胞使其致炎后，再加以二甲双胍处理，则可以抑制 NLRP3 炎症小体通路，减少炎症因子 IL-1β 和 IL-18 的分泌，缓解炎症对细胞增殖和凋亡的影响。也就是说，在体外细胞模型中，二甲双胍可以通过激活或抑制 NLRP3 炎症小体通路，对 HaCaT 细胞的增殖和凋亡发挥双向调节作用。

由于 LP 目前没有动物模型，本研究试图寻找可替代的动物模型。有多篇文献曾报道咪喹莫特涂抹可导致患者出现 LP[22-23]，且 LP 和银屑病存在一个共同的病理变化就是角质形成细胞异常增殖，所以本研究采用了咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样皮炎模型来替代 LP 模型，从动物整体水平上观察二甲双胍对皮肤炎症的缓解作用。结果显示，二甲双胍能够改善咪喹莫特诱导的小鼠皮肤损害，减轻炎症反应，即在体内动物模型中，二甲双胍能发挥抗炎效应，与已有的研究结果相似[24]，二甲双胍的抗炎作用使其具有治疗皮肤炎症性疾病的潜力。

4 小结

综上所述，本研究证明二甲双胍可激活或抑制 NLRP3 炎症小体通路，双向调节 HaCaT 细胞的增殖和凋亡，对于已致炎的 HaCaT 细胞，二甲双胍通过抑制 NLRP3 炎症小体活性，可缓解炎症对其增殖和凋亡的影响。我们的研究丰富了二甲双胍发挥抗炎作用的分子靶点和信号通路，加深了对二甲双胍发挥有益生物学效应的分子机制的理解，为开发基于分子机制的治疗 LP 的药物提供了理论基础，临床上或可利用这一特性，将二甲双胍应用于治疗 LP 等皮肤炎症性疾病。当然，由于缺乏理想的动物模型，我们的研究也存在局限性，咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样皮炎模型并不能充分模拟 LP 皮炎模型，未来我们将在临床患者中观察二甲双胍对 LP 的疗效，以弥补研究不足之处。

作者贡献：田珂提出主要研究目标，负责研究的实施，撰写论文初稿；冷秋枫负责数据的收集与整理；吕晶负责统计分析；苗国英监督管理研究进程；王新慧、谢辉、刘渠进行具体实验；姚春霞设计研究方案、绘制图表、修改论文，负责文章的质量控制与审查，对文章整体负责。

本文无利益冲突。

姚春霞：https://orcid.org/0000-0002-9663-1151

参考文献

[1] MCDERMOTT E，SOLOMON N，SILVA A M，et al. Lichen planus [J]. RadioGraphics，2023，43（4）：e220200. DOI：10.1148/rg.220200.

[2] TZIOTZIOS C，LEE J Y W，BRIER T，et al. Lichen planus and lichenoid dermatoses：clinical overview and molecular basis [J]. J Am Acad Dermatol，2018，79（5）：789-804. DOI：10.1016/j.jaad.2018.02.010.

[3] MAYMONE M B C，GREER R O，KESECKER J，et al. Premalignant and malignant oral mucosal lesions：clinical and pathological findings [J]. J Am Acad Dermatol，2019，81（1）：59-71. DOI：10.1016/j.jaad.2018.09.060.

[4] Eduardo Calonje. 麦基皮肤病理学：与临床的联系 [M]. 孙建方，高天文，涂平主译 . 北京：北京大学医学出版社，2017：230-232.

[5] FIOCCO Z，KUPF S，PATZAK L，et al. Quality of life and psychopathology in lichen planus：a neglected disease burden [J]. Acta Derm Venereol，2021，101（12）：adv00619. DOI：10.2340/actadv.v101.442.

[6] 谢辉，董宿利，王新慧，等 . 扁平苔藓病因及发病机制研究进展 [J]. 皮肤病与性病，2021，43（2）：179-180. DOI：10.3969/j.issn.1002-1310.2021.02.009.

[7] FROMME M，SCHNEIDER C V，SCHLAPBACH C，et al. Comorbidities in lichen planus by phenome-wide association study in two biobank population cohorts [J]. Br J Dermatol，2022，187（5）：722-729. DOI：10.1111/bjd.21762.

[8] MANATIS-LORNELL A，OKHOVAT J P，MARKS D H，et al. Comorbidities in patients with lichen planopilaris：a retrospective case-control study [J]. J Am Acad Dermatol，2020，83（1）：205-208. DOI：10.1016/j.jaad.2019.07.018.

[9] LEASURE A C，ACOSTA J N，SANSING L H，et al. Association of lichen planus with cardiovascular disease：a combined analysis of the UK Biobank and All of Us Study [J]. J Am Acad Dermatol，2022，87（2）：454-456. DOI：10.1016/j.jaad.2021.09.030.

[10] DAYE M，TEMIZ S A，IŞıK B. The relationship between lichen planus and metabolic syndrome [J]. J Cosmet Dermatol，2021，20（8）：2635-2639. DOI：10.1111/jocd.13905.

[11] FORETZ M，GUIGAS B，VIOLLET B. Metformin：update on mechanisms of action and repurposing potential [J]. Nat Rev Endocrinol，2023，19（8）：460-476. DOI：10.1038/s41574-023-00833-4.

[12] CHANG J E，CHOI M S. A molecular perspective on the potential benefits of metformin for the treatment of inflammatory skin disorders [J]. Int J Mol Sci，2020，21（23）：8960. DOI：10.3390/ijms21238960.

[13] 肖塔 . 二甲双胍对 UVB 辐射后急性皮肤光损伤的保护作用研究 [D]. 北京：北京协和医学院，2021.

[14] HUA Y，ZHENG Y，YAO Y R，et al. Metformin and cancer hallmarks：shedding new lights on therapeutic repurposing［J］. J Transl Med，2023，21（1）：403. DOI：10.1186/s12967-023-04263-8.

[15] KULKARNI A S，GUBBI S，BARZILAI N. Benefits of metformin in attenuating the hallmarks of aging［J］. Cell Metab，2020，32（1）：15-30. DOI：10.1016/j.cmet.2020.04.001.

[16] BHARATH L P，NIKOLAJCZYK B S. The intersection of metformin and inflammation［J］. Am J Physiol Cell Physiol，2021，320（5）：C873-C879. DOI：10.1152/ajpcell.00604.2020.

[17] MOON J，LEE S Y，CHOI J W，et al. Metformin ameliorates scleroderma via inhibiting Th17 cells and reducing mTOR-STAT3 signaling in skin fibroblasts［J］. J Transl Med，2021，19（1）：192. DOI：10.1186/s12967-021-02860-z.

[18] LAMBERTS A，DIERCKS G F H，PAS H H，et al. Non-bullous lichen planus pemphigoides：a case report［J］. Acta Derm Venereol，2020，100（10）：adv00156. DOI：10.2340/00015555-3523.

[19] WANG X Y，LI S T，SONG H M，et al. METTL14-upregulated miR-6858 triggers cell apoptosis in keratinocytes of oral lichen planus through decreasing GSDMC［J］. Commun Biol，2023，6（1）：976. DOI：10.1038/s42003-023-05360-6.

[20] 刘瑛. 二甲双胍通过 mTOR 信号通路对 Hacat 角质形成细胞增殖的影响［D］. 济南：山东大学，2015.

[21] PETRASCA A，HAMBLY R，KEARNEY N，et al. Metformin has anti-inflammatory effects and induces immunometabolic reprogramming via multiple mechanisms in hidradenitis suppurativa［J］. Br J Dermatol，2023，189（6）：730-740. DOI：10.1093/bjd/ljad305.

[22] WANG H W，MIAO F，SHI L，et al. Imiquimod-induced localized vitiligo in wife and lichen planus in husband［J］. Chin Med J，2013，126（13）：2593.

[23] ZHAO L S，LI K，LONG F Q. Development of lichen planus associated with topical imiquimod therapy［J］. Dermatol Ther，2020，33（3）：e13367. DOI：10.1111/dth.13367.

[24] MALAEKEH-NIKOUEI A，SHOKRI-NAEI S，KARBASFOROUSHAN S，et al. Metformin beyond an anti-diabetic agent：a comprehensive and mechanistic review on its effects against natural and chemical toxins［J］. Biomedecine Pharmacother，2023，165：115263. DOI：10.1016/j.biopha.2023.115263.

（收稿日期：2024-03-12；修回日期：2024-04-17）

（本文编辑：康艳辉）